



## Short note [Nota corta]

**VARIACIÓN SOMACLONAL EN PLANTAS DE *Phalaenopsis* sp. var. Dudú  
 REGENERADAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA †**
**[SOMACLONAL VARIATION OF *Phanaenopsis* sp. var. Dudu PLANTS  
 REGENERATED BY DIRECT SOMATIC EMBRIOGENESIS]**

**A.M. Arzate-Fernández<sup>a\*</sup>, I. Martínez-Velasco<sup>a</sup>, J.I. Reyes-Díaz<sup>b</sup>,  
 T.H. Norman-Mondragón<sup>a</sup>, M.C. Corona-Rodríguez<sup>a</sup>, E.T. Cano-Perdono<sup>a</sup>  
 and J.L. Hernández-Rodríguez<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 11.5, Campus Universitario “El Cerrillo”, CP. 50200, Toluca, Estado de México, México. \*Email: amaury1963@yahoo.com.mx

<sup>b</sup> Dirección de Procesos Alimentarios y Química Área Biotecnología. Unidad Académica de Capulhuac, Universidad Tecnológica del Valle de Toluca. Carretera del Depto. del Distrito Federal km 7.5, 52044 Santa María Atarasquillo, México

\*Corresponding author

### SUMMARY

**Background:** Nowadays, a growing demand for hybrids of *Phalaenopsis* sp. exists to satisfy this demand it is necessary to develop protocols for massive propagation that ensure high percentages of clonal regeneration, such as somatic embryogenesis. Besides, studying genetic variation within regenerated plants offers a greater understanding of the suitability of the micropropagation protocol in relation with genetic stability of the materials used. **Objective:** The present research work aimed to evaluate three concentrations of two types of plant growth regulators (RCV). 6-benzylaminopurine cytokinin (BA) (1.0, 2.0 y 3.0 mgL<sup>-1</sup>) in combination with three concentrations of 2,4-dichlorofenoxyacetic acid (2,4-D) (3.0, 4.0, 5.0 mgL<sup>-1</sup>), for the induction of somatic embryos. In addition, the genetic stability of the regenerated plants was analyzed using molecular markers type RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). **Methodology:** The induction of somatic embryogenesis was induced from two leaf explants with different stages of develop from 15-20 cm in height *Phalaenopsis* sp. var. Dudú seedlings, cultivated *in vitro*; first leaf as mature explant (PH) and third leaf as young explant (TH). **Results:** The highest number of regenerated plants was 29.8 at 135 days after the start of the culture (ddic) with 2.0 and 5.0 mgL<sup>-1</sup> of BA and 2,4-D, respectively, using TH as explant. In the morphogenetic response of the regenerated explants, a correlation was observed between the age of the explant and the RCV concentration. Polymorphic bands were observed with the four primers used, indicating somaclonal variation in regenerated plants. **Implications:** The results obtained provide an alternative for regeneration, as well as offering a methodology to initiate genetic improvement programs in *Phalaenopsis* sp. var. Dudú. **Conclusions:** *In vitro* regeneration of *Phalaenopsis* sp. var. Dudú by somatic embryogenesis was achieved, as well as the analysis of the genetic integrity of the regenerated material.

**Key words:** *Phalaenopsis* sp.; Protocorm like Bodies (PLB's); *in vitro* culture; genetic variation; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; benzylaminopurine; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

### RESUMEN

**Antecedentes:** Actualmente existe una creciente demanda de híbridos de *Phalaenopsis* sp., por lo cual es necesario desarrollar protocolos de propagación masiva que aseguren altos porcentajes de regeneración clonal tal como la técnica de embriogénesis somática. Así mismo, estudiar la variación genética dentro de las plantas regeneradas ofrece un mayor conocimiento de los alcances del protocolo de micropropagación en relación a la estabilidad genética de los materiales empleados. **Objetivo:** En el presente trabajo de investigación se evaluó la combinación de tres concentraciones y dos tipos de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), la citocinina bencilaminopurina (BA) (1.0, 2.0 y 3.0 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con tres concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) (3.0, 4.0 y 5.0

† Submitted August 23, 2021 – Accepted February 14, 2022.



mgL<sup>-1</sup>), para la inducción de embriones somáticos, además, se analizó la estabilidad genética de las plántulas regeneradas mediante marcadores moleculares tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, por sus siglas en inglés). **Metodología:** La embriogénesis somática se indujo a partir de explantes de hoja con distintos grados de desarrollo: primera hoja se consideró como explante maduro (PH) y la tercera hoja como explante joven (TH), obtenidas de una plántula de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú cultivadas *in vitro*, de 15-20 cm de altura. **Resultados:** El mayor número de plantas regeneradas fue de 29.8 a los 135 días después de iniciado el cultivo (ddic) con 2.0 y 5.0 mgL<sup>-1</sup> de BA y 2,4-D, respectivamente, utilizando como explante la TH en la respuesta morfogénica de los explantes regenerados, se observó una correlación entre la edad del explante y la concentración de RCV. El análisis de la variación genética mostró cambios en los patrones de bandedo, observando bandas polimórficas con los cuatro iniciadores utilizados, aludiendo variación somaclonal en las plantas regeneradas. **Implicaciones:** Los resultados obtenidos aportan una alternativa de regeneración, además de ofrecer una metodología para iniciar programas de mejoramiento genético en *Phalaenopsis* sp. var. Dudú. **Conclusiones:** Se logró la regeneración *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú mediante embriogénesis somática, así como la detección de cambios genéticos en el material regenerado.

**Palabras clave:** *Phalaenopsis* sp.; Protocorm like Bodies (PLB's); cultivo *in vitro*; variación genética; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 6-bencilaminopurina; amplificación aleatoria de polimorfismo de ADN (RAPD).

## INTRODUCCIÓN

Con un estimado de 750 géneros diferentes y 28, 000 especies alrededor del mundo, la familia Orchidaceae es probablemente la más extensa del reino Plantae, con múltiples estrategias de entrecruzamiento y características morfológicas, además, gracias a su amplio rango de compatibilidad genética entre géneros y especies se ha estimulado la industria de la hibridación (Paek *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2021). Asimismo, el desarrollo de la globalización económica, la demanda del mercado de orquídeas en cantidad y variedad ha aumentado año tras año, obligando a los científicos y productores a desarrollar nuevas variedades con apariencias novedosas, resistencia mejorada y características de calidad (Kamboj, 2020). El descubrimiento y desarrollo de la germinación asimbiótica en las semillas de orquídeas (Knudson, 1922; Knudson, 1946), abrió paso al desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales para su micropropagación, posteriormente esta técnica *in vitro* ha hecho posible la comercialización a gran escala de estas plantas (Choy y Yong, 2004). Un género importante es *Phalaenopsis*, el cual tiene un alto valor económico en el mercado florícola del mundo (Chen y Chang, 2006), siendo una de las orquídeas más populares, para 2018, la Royal Horticultural Society ha registrado 92 plantas nativas y 34,112 híbridos de este género (Huang *et al.*, 2012). Se ha reportado que el cultivo *in vitro* de algunas especies de orquídeas puede seguir a la formación de protocormos (Morel, 1960, 1965; Zhao *et al.*, 2008), los cuales a su vez producen un gran número de PLBs (Protocorm like Bodies, por sus siglas en inglés), debido a que pueden ser multiplicados en un tiempo relativamente corto (Yam y Arditti, 2009), sumado a su alta frecuencia de formación de PLB y eficiencia de su conversión a plantas, la propagación masiva a través de la formación de PLB se considera un protocolo eficiente para la propagación de orquídeas (Chen y Chang 2004; Huan *et al.*, 2004; Jheng *et al.*, 2006).

La micropropagación ha demostrado ser una técnica factible en la regeneración masiva de plantas de *Phalaenopsis*. Sin embargo, el proceso de rediferenciación celular al que es sometido el tejido vegetal en el medio de cultivo puede provocar cambios genéticos y fenotípicos, dichas alteraciones son llamadas variación somaclonal (VS) (Larking y Scowcroft, 1981). Esta variación es difícil de evaluar *in vitro* entre las plantas regeneradas por las diferencias temporales en el inicio del brote, debido a la limitada expansión foliar en los cultivos *in vitro*. Por ello, el análisis de ADN y diversas técnicas genéticas se han utilizado para confirmar y caracterizar la variabilidad en plantas regeneradas por esta vía logrando detectar cambios genéticos dentro de las poblaciones estudiadas (Karp *et al.*, 1991; Cassells y Curry, 2001), siendo una de las técnicas utilizadas aquellas basadas en la amplificación aleatoria del polimorfismo (RAPD) (Palombi *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2015). En este sentido, la variación somaclonal es de interés en programas de mejoramiento genético (Jain *et al.*, 2013), para garantizar la fidelidad genética del material inicial, y así conservar las características del material a propagar. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue lograr la regeneración de plantas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú mediante embriogénesis somática directa y la evaluación de su estabilidad genética por PCR, usando marcadores RAPDs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (LBMV) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF), Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

## Material vegetal

Se empleó una plántula *in vitro* de la orquídea *Phalaenopsis* sp. var. Dudú de 15-20 cm de altura, obtenida a partir de un PLB previamente cultivado *in vitro* (planta madre), utilizando como explante inicial segmentos de hojas de 2-5 mm<sup>2</sup> (Figura 1A) con diferente grado de madurez fisiológica, considerando a la primer hoja formada como explante maduro (PH) y la tercer hoja formada como explante joven (TH), los segmentos de hoja fueron sumergidos en una solución antioxidante previendo la posible liberación de fenoles al cortar el tejido.

## Inducción de embriones somáticos

Veinte segmentos de hoja, provenientes tanto de PH como TH, fueron colocados en cajas Petri con el envés en contacto con el medio de cultivo, que consistió en sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25%, 60 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) y 8 gL<sup>-1</sup> de agar, el pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl, posteriormente se esterilizó en un autoclave a 121°C y 1.1 kg/cm<sup>2</sup> de presión por 20 min. Se evaluó el efecto de tres concentraciones de la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) (1.0, 2.0 y 3.0 mgL<sup>-1</sup>) y tres de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (3.0, 4.0 y 5.0 mgL<sup>-1</sup>), en ambos tipos de explante (PH y TH), evaluando un total de 18 tratamientos con dos repeticiones, cada explante se consideró como una unidad experimental. Los explantes se mantuvieron en completa oscuridad a una temperatura de 25°C por 15 días, terminado este periodo, los explantes se transfirieron a condiciones de luz/oscuridad (25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con un fotoperiodo de 16/8 h a 25°C. Se registró el número de embriones somáticos (ES) obtenidos a los 60 días después de iniciado el cultivo (ddic), considerando solo aquellos embriones con un diámetro mayor a 2 mm.

## Germinación de embriones somáticos

Los ES obtenidos a los 60 ddic se transfirieron a un medio de crecimiento de plántula (CP2), formulado con: sales MS al 50% sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV), adicionado con 20 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mL<sup>-1</sup> de agua de coco, 4 gL<sup>-1</sup> de agar, 2 gL<sup>-1</sup> de gelrite y 0.5 gL<sup>-1</sup> de carbón activado, ajustando el medio a un pH de 5.5 ± 0.1.

El número de plántulas regeneradas se registró a los 135 ddic, considerando como plántulas aquellas con dos hojas, un mínimo de dos raíces y de 4-6 cm de altura. Cabe señalar que, durante todas las etapas del cultivo *in vitro* los explantes fueron transferidos cada 30 días a medio de cultivo fresco para disminuir la formación de fenoles.

## Adaptación a condiciones *ex vitro*

Una vez que las plántulas regeneradas alcanzaron una altura de entre 4-6 cm se les eliminó los residuos de agar con agua destilada estéril, se sumergieron en una solución al 25% del fertilizante Growcare®. A continuación fueron llevadas a un microtúnel dentro de un invernadero, colocándolas en charolas con un sustrato formado por fibra de coco y Peat Moss (relación 1:1). Las plantas permanecieron en estas condiciones durante 30 días con un promedio de 50% de humedad relativa (HR) y una temperatura entre 20-35 °C.

## Análisis estadístico

Se evaluó el efecto de la concentración de dos RCV y la posición de la hoja en la inducción de ES, para las variables número de ES (60 ddic) y número de plántulas regeneradas (135 ddic) se realizó una prueba de medias, ajustando los datos con el LogN<sub>10</sub> de las variables más 1, con la finalidad de reducir el error debido a las altas tasas de mortalidad en los tratamientos. La comparación de medias en los tratamientos se efectuó mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher, a un nivel de confianza del 95% con el programa SAS Institute Inc. Cary NC. USA versión 9.0 del 2002.

## Análisis de la variación somaclonal

Para la evaluación de la variación somaclonal (VS) se utilizó tejido foliar de las plántulas regeneradas a los 135 ddic provenientes de los tratamientos con las dosis más altas de ambos RCV (T8 y T9). Para efectuar el análisis se eligieron al azar tres plántulas regeneradas (clones) por cada tipo de explante y de cada tratamiento, dando un total de doce clones evaluados (Tabla 1), los cuales fueron comparados con la planta madre. Cabe señalar que el tejido seleccionado fue vigoroso y presentaba un desarrollo vegetativo normal.

**Tabla 1. Origen de las muestras de ADN utilizadas en el análisis de variación somaclonal.**

Explante	Tratamiento (BA-2,4-D mgL <sup>-1</sup> )	No. Clon	Nombre de muestra
Explante joven (TH)	T8 (2.0-5.0)	1	M1
		2	M2
		3	M3
	T9 (3.0-5.0)	1	M4
		2	M5
		3	M6
Explante maduro (PH)	T8 (2.0-5.0)	1	M7
		2	M8
		3	M9
	T9 (3.0-5.0)	1	M10
		2	M11
		3	M12

## Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo siguiendo el procedimiento de Arzate-Fernández *et al.* (2005), utilizando 200 mg de tejido foliar de los clones y de la planta madre (control positivo), una vez extraído el ADN, éste se diluyó en una solución buffer tris-EDTA (TE) para ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un congelador General Electric<sup>MR</sup> hasta su posterior uso.

## Amplificación por PCR y electroforesis de ADN

Para verificar la fiabilidad de los procesos: se incluyó como control positivo el ADN de la planta madre. Se utilizaron cuatro marcadores moleculares tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, por sus siglas en inglés) de 10 pares de bases (pb); OPA 01 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA 04 (5'-ATTCGGGTCG-3'), OPA 09 (5'-GGGTAACGCC-3') y POQ 06 (5'-GAGCGCCTTG-3') (Kishor y Devi, 2009). La reacción de PCR fue realizada en un volumen total final de 10  $\mu\text{L}$  el cual contenía; 0.2  $\mu\text{L}$  del iniciador (20  $\mu\text{M}$ ), 0.1  $\mu\text{L}$  de My TaqDNA polymerase (Bioline<sup>TM</sup>), 2.0  $\mu\text{L}$  de My Reaccion Buffer (Bioline<sup>TM</sup>), 1.0  $\mu\text{L}$  de ADN genómico y 6.7  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ.

Los ciclos de amplificación del ADN se realizaron en un termociclador marca Multigene Optimax Thermal Cycler<sup>TM</sup> modelo TC9610/TC9610-230, siguiendo las condiciones de amplificación descritas por Kishor y Devi (2009).

La separación de los fragmentos se realizó en cámaras de electroforesis horizontal marca EasyCast<sup>TM</sup> modelo Minipac III serie 85963 durante 90 minutos a 80 V y 120 mA que contenían 100 ml de solución buffer de 1X TAE (Tris-acetato-EDTA) y utilizando un gel de agarosa tipo II al 1%. Las muestras se flanquearon con un marcador escalera (100-2000 pb) marca Bioline<sup>TM</sup> EasyLadder I 100 Lanes. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un Transiluminador marca UVP<sup>TM</sup> modelo MP20 (P/N 95-0398-01).

Para el análisis de la VS se compararon visualmente los patrones de bandeado amplificados por cada iniciador para cada clon, con el objetivo de identificar posibles variaciones genéticas entre los clones regenerados y la planta madre (control positivo).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inducción de embriones somáticos

La formación de embriones somáticos (ES) opacos y turgentes en la periferia y superficie de ambos tipos de explante (TH y PH) se observó a partir de los 15 ddc,

y a los 60 ddc los ES alcanzaron una forma globular (Figura 1B y C). A pesar de las múltiples estrategias realizadas para disminuir la oxidación en el tejido foliar (incubación en oscuridad, subcultivos semanales (Park *et al.*, 2002), y el uso de antioxidantes como el carbón activado (Ernst, 1975), el 43.04% de los explantes presentaron problemas de este tipo: concordando con lo observado en explantes de hoja de *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa al utilizar 0.1 y 1.0  $\text{mgL}^{-1}$  de ácido naftalenacético (NAA), respectivamente, donde los explantes tendieron a necrosarse (Chen y Chang, 2006). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) puede ser activada por inductores específicos (como parte del metabolismo natural de la planta) o también por mecanismos no específicos, por ejemplo en respuesta a un estrés (Azofeifa, 2009). Diversas investigaciones indican que los bajos niveles de luz no garantizan la reducción de la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y la oxidación de fenoles como son los casos de *Eucalyptu tereticornis* (Das y Mitra, 1990), *Garrya elliptica* y *Hamamelis* sp. (Marks y Simson, 1990), en donde la oxidación de los fenoles en los explantes no disminuyó a pesar de su incubación inicial en oscuridad. Por otro lado, dentro de las auxinas, el 2,4-D y en las citocininas, el BA, son los RCV que cuentan con un mayor número de referencias asociadas con la producción de oxidación de tejidos. Zhao *et al.* (2008) mencionan que en el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación pueden ser causados principalmente por el efecto abrasivo del desinfectante, cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, entre otros. Así mismo, Azofeifa (2009) sugiere que en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de cortar los explantes, muchos de ellos comienzan a perder su coloración e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo. Se conoce que las ROS se generan en diferentes organelas celulares como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes generados en los explantes (Karp, 1991). Lo anterior explica lo observado en los explantes utilizados, formándose círculos oscuros en la zona de contacto explante-medio de cultivo.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los mejores tratamientos para la inducción de ES a los 60 ddc utilizando ambos explantes (TH y PH), ya que, el mayor número de ES osciló entre 14.0-14.5 (Tabla 2), existiendo una diferencia de solo 0.5 ES. Sin embargo, se observó una correlación entre la concentración de los RCV y el tipo de explante, puesto que la dosis más alta de 2,4-D (5.0  $\text{mgL}^{-1}$ ) fue necesaria para generar el mayor número de ES utilizando TH, con excepción del T9 en donde el resultado se vio afectado por la dosis alta de BA (3.0  $\text{mgL}^{-1}$ ), mientras que con el explante PH el mayor número de ES se generó con la menor concentración

(1.0 mgL<sup>-1</sup>) de esta auxina. Al parecer la adición de la citocinina BA fue complementaria en la inducción de ES, ya que los resultados indican que con 1.0 mgL<sup>-1</sup> de este regulador es suficiente para obtener la mayor cantidad de ES (Tabla 2). Es muy posible señalar la acción endógena de ambos RCV en el explante, ya que posterior al cambio de medio de cultivo CP2 se observó un continuo desarrollo de PLBs en el explante inicial sin la presencia de RCV, sugiriendo un efecto residual.

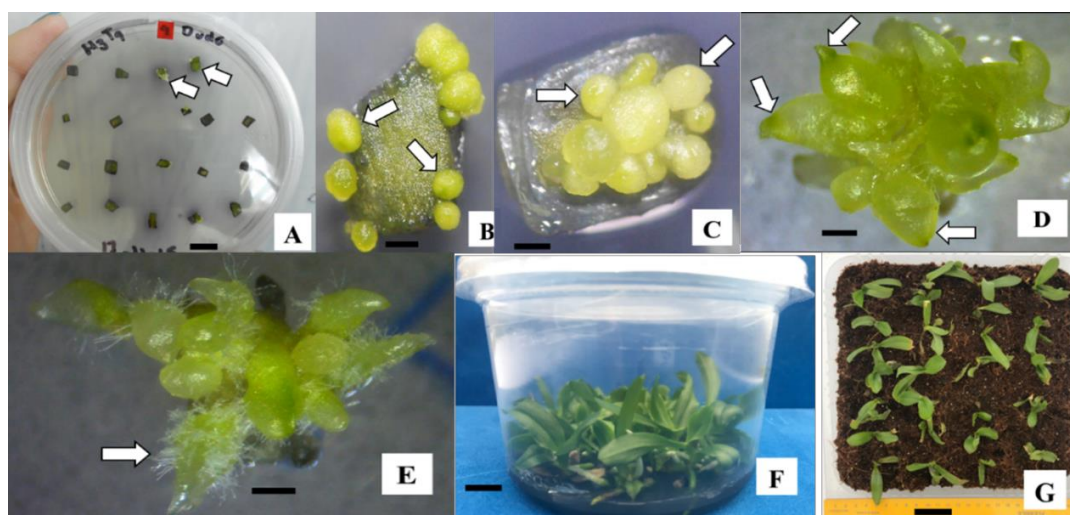
La diferenciación de los ES hasta la visualización de los primordios foliares (Figura 1D) y la aparición de diminutos pelos radiculares (Figura 1E) comenzó a los 90 ddc. El mayor número de plantas regeneradas

(PRG) a los 135 ddc se obtuvo con el explante PH siendo de 29.8 PRG/explante (Figura 1F) utilizando el T8 (2.0-5.0 mgL<sup>-1</sup> BA-2,4-D), superando lo observado por Chen y Chang (2006) en *Phalaenopsis amabilis*, quienes reportaron 19.4 ES por explante utilizando 3.0 mgL<sup>-1</sup> de TDZ; asimismo con el explante TH se obtuvieron 18.6 PRG/explante utilizando el T6 (3.0-4.0 mgL<sup>-1</sup> BA-2,4-D) (Tabla 2). Lo anterior pudo deberse al efecto residual de los RCV utilizados en la fase previa (inducción de ES), los cuales a través del tiempo fueron incrementando el número de ES a pesar del cambio de medio de cultivo sin RCV. Sin embargo, el cambio de medio influyó en la supervivencia del material vegetal regenerado en el caso de ambos tejidos

**Tabla 2. Respuesta morfogénica de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú en los tratamientos evaluados para la inducción de embriones somáticos y su posterior regeneración a plántulas.**

T*	Reguladores de Crecimiento Vegetal (mgL <sup>-1</sup> )		Embriones somáticos (60 ddc)		Plántulas regeneradas (135 ddc)	
	BA	2,4-D	TH	PH	TH	PH
1	1.0	3.0	2.0 e	14.5 a	0	15.4 c
2	2.0	3.0	10.0 b	13.6 a	7.5 b	14.5 c
3	3.0	3.0	2.0 e	13.0 a	0	2.5 e
4	1.0	4.0	10.0 b	11.5 b	0	27.0 a
5	2.0	4.0	2.0 e	7.5 c	0	11.6 d
6	3.0	4.0	8.5 c	8.5 c	18.6 a	15.5 c
7	1.0	5.0	14.0 a	10.0 b	9.0 b	0
8	2.0	5.0	13.0 a	8.5 c	7.0 b	29.8 a
9	3.0	5.0	4.0 d	8.0 c	5.0 c	19.0 b

Letras iguales, no hay estadísticamente diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), utilizando la prueba DMS de Fisher, \*T=tratamiento.



**Figura 1.** Regeneración *in vitro* de plantas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú, vía embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. A) Distribución del tejido foliar en Caja Petri a los 30 ddc, con 3 mgL<sup>-1</sup> de BA y 5 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D; flechas señalan los embriones somáticos formados en el explante (barra=10 mm). B y C) tejido foliar a los 60 ddc con ES en su periferia (B) y superficie (C). D) Diferenciación de primordios foliares (flechas) en los ES a los 90 ddc en el medio CP2 (barra=3 mm). E) Formación de raíces (flecha) en clusters de ES a los 90 ddc (barra= 3 mm). F) Plántulas regeneradas de 4-6 cm de altura, con hojas y raíces a los 135 ddc (barra=2 cm). G) Plántulas regeneradas en el proceso de aclimatación bajo condiciones de invernadero a los 160 ddc (barra=3 cm).



acentuándose con TH donde el tejido comenzó a oxidarse en la mayoría de los tratamientos, terminando en una necrosis parcial o total de los explantes, este cambio morfológico influyó en los resultados obtenidos, ya que no se encontró una asociación entre los mejores tratamientos de inducción de ES y su posterior regeneración a plántulas.

No se encontraron diferencias significativas entre el total de los tratamientos, la edad fisiológica del explante y su interacción con los RCV usados. Solo la dosis por separado y la combinación de los RCV influyeron en el número de ES obtenido y a su posterior desarrollo a plántulas. No obstante, la interacción de la edad fisiológica del explante y la cantidad de RCV individual si juegan un papel importante en la respuesta *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú.

### Adaptación *ex vitro*

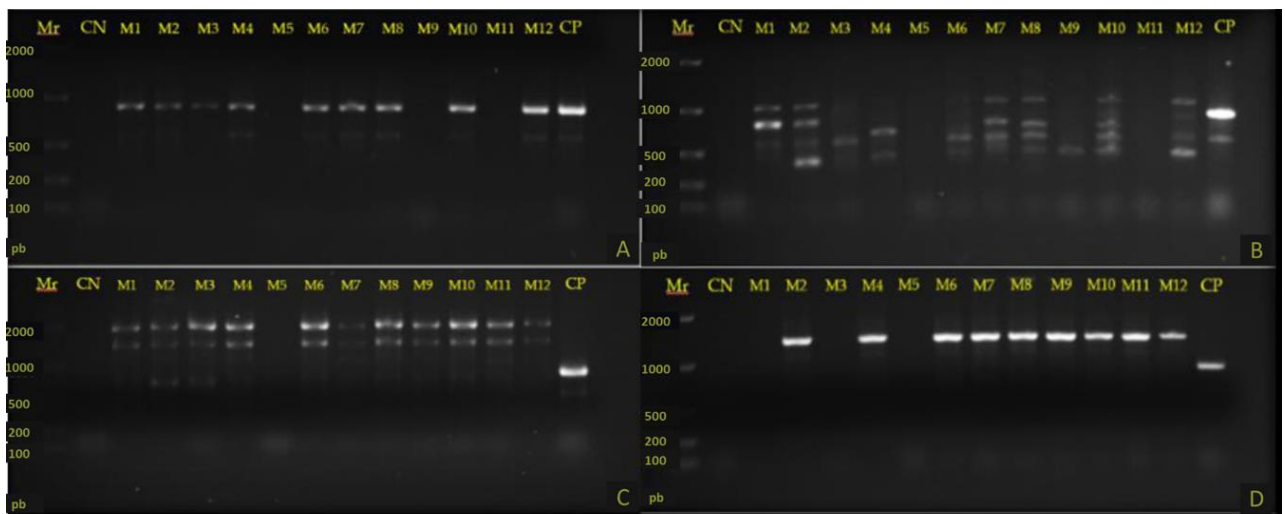
Pasados 135 ddic, el total de las plántulas regeneradas *in vitro* habían desarrollado al menos dos hojas y raíces por lo que fueron transferidas a charolas (Figura 1G). Después de 3 semanas en adaptación, el porcentaje de supervivencia de las plántulas fue de 96%.

### Análisis de la Variación somaclonal

En el presente estudio, los cuatro iniciadores utilizados para el análisis de la variación somaclonal (VS) generaron fragmentos claros de entre 400 y 2000 pb,

con excepción de la muestra cinco (M5) la cual no amplificó con ninguno de los iniciadores utilizados. A manera de verificación se realizó una nueva extracción de ADN obteniéndose los mismos resultados.

Utilizando el iniciador OPA 01 (Figura 2A) se amplificaron dos bandas de un tamaño de 600 y 900 pb, la muestra tres (M3) obtenida con el explante TH en el T8 (2.0-5.0 mgL<sup>-1</sup> BA-2,4-D) presentó variación al no amplificar la banda de 500 pb, de igual manera al utilizar el T9 (3.0-5.0 mgL<sup>-1</sup> BA-2,4-D) con el explante PH la M9 y M11 no amplificaron ninguna banda lo que indica una posible VS obtenida con este iniciador. En el caso del iniciador OPA 04 (Figura 2B) se amplificaron un total de siete bandas en un rango de tamaño de 400 a 1100 pb, todas ellas polimórficas obteniéndose con este indicador el mayor porcentaje de polimorfismo (100%) de los cuatro iniciadores, caso contrario a lo observado con el iniciador OPA 09 (rango de 800-2000 pb) y en el cual no existió variación genética dentro de ninguna de las muestras de los clones evaluados (Figura 2C). Finalmente, el iniciador OPQ 06 generó una banda de 1500 pb, ésta no fue amplificada en las muestras M1 y M3, indicando un posible cambio genético dentro de las plantas regeneradas con el explante TH proveniente del T8 (Figura 2D). Cabe señalar que sólo al utilizar el iniciador OPA 01 (Figura 2A) se encontró estabilidad genética en relación al DNA extraído de la planta madre (CP), lo que indica una alta variación genética del material vegetal regenerado respecto al CP.



**Figura 2.** Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores tipo RAPD en clones de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú, obtenidos de dos explantes diferentes (PH=explante maduro, TH=explante joven) mediante la técnica de embriogénesis somática directa. A) Iniciador OPA 01, B) Iniciador OPA 04, C) Iniciador OPA 09, D) Iniciador OPQ 06. M1-M3 clones regenerados a partir del explante joven (TH) en el T8 (BA 2.0-2,4-D 5.0 mgL<sup>-1</sup>), M4-M6 clones regenerados a partir del explante joven (TH) en el T9, M7-M9 clones regenerados a partir del explante maduro (PH) en el T9 (BA 3.0-2,4-D 5.0 mgL<sup>-1</sup>), M10-M12 clones regenerados a partir del explante maduro (PH) en el T9. CP= control positivo, CN= control negativo, pb= pares de bases. Mr= marcador de peso molecular.

A pesar de la pequeña población estudiada y del número de iniciadores, la respuesta de los materiales analizados fue evidente. Los cuatro iniciadores utilizados indicaron VS en al menos una de las muestras estudiadas, mostrando una alta inestabilidad en el tejido propagado en ambos tratamientos (T8 y T9), utilizando ambos tipos de explantes (PH y TH). Por lo tanto, en este estudio la edad fisiológica del explante no influyó en la estabilidad genética de las plantas regeneradas. De acuerdo a estudios previos, las tazas, tipos y efectos de la variación somaclonal son sumamente distintos entre especie, genotipo, sistema de regeneración, número de subcultivos etc. (Bairu *et al.*, 2011; Wang y Wang, 2012; Peng *et al.*, 2015). El sistema de regeneración utilizado en el presente trabajo consistió en varios pasos, incluyendo subcultivos previos de PLB's que atravesó el tejido inicial o planta madre, inducción de PLB's y formación de plántulas. Wang *et al.* (2019) observaron VS en somaclones de *Oncidium 'Milliongolds'* coincidiendo con la presente investigación al utilizar un sistema de regeneración a través de PLB's y con largos tiempos de cultivo del explante inicial. Adicionalmente, ambos tratamientos (T8 y T9) contenían la dosis más alta del RCV 2,4-D, (5.0 mgL<sup>-1</sup>); al respecto se ha reportado que esta auxina puede influir en la cantidad de variación genética de los brotes regenerados (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Otra posible explicación de la variación genética encontrada es el nivel de oxidación que sufrieron los explantes durante el proceso de micropropagación. Nagl (1990) ha discutido la relación de la variación somaclonal por el estrés y los cambios ontogénicos en los genomas de las plantas argumentando que el genoma de las plantas es inherentemente fluido, ejemplo de ello es *Linum usitatissimum* (Schneeberger y Cullis, 1991) y *Musa* spp. (Cullis *et al.*, 2006) que están bien caracterizados por presentar inestabilidades genéticas asociadas a la variación somaclonal por estrés oxidativo. El incremento de ROS está asociado con un estrés biótico y abiótico (Bartosz, 1997). ROS tiene un rol en la inducción de variabilidad en el genoma de la planta por la activación de transposones (Grandbastien *et al.*, 1997). Si bien, gran parte de los efectos inducidos por ROS, debido al corte del explante, pueden ser localizados, algunos ROS pueden migrar a través de las membranas y causar efectos directamente en ella o mediante la peroxidación lipídica de la membrana, en el nivel de ADN de las células bajo estrés y a las células circundantes. ROS han sido confirmadas como causantes de cambios epigenéticos y genéticos en el ADN (Cassells y Curry, 2001). No obstante, la VS con el apoyo de una regeneración eficiente, puede ser utilizada para la obtención de material vegetal con caracteres deseados (Gutiérrez *et al.*, 2003) en programas de mejoramiento genético. Por lo anterior es importante dar seguimiento al material vegetal obtenido, ya que la variación

somaclonal puede ser espontánea y los cambios podrían ser heredables o no (Anu *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

Se logró la propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú, utilizando 2.0-5.0 mgL<sup>-1</sup> BA-2,4-D en el explante maduro (PH).

El análisis de ADN reveló inestabilidad genética en las plantas regeneradas mediante embriogénesis somática utilizando iniciadores tipo RAPD.

Este es el primer reporte de la regeneración *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. var. Dudú, así como el análisis de la integridad genética del material regenerado. Estos resultados pueden ser utilizados en un programa de mejoramiento genético en orquídeas.

**Funding.** This work was funded by the authors.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest associated with the results of this publication. Likewise, we express our agreement with the content of the document and with the editorial procedures of the journal Tropical and Subtropical Agroecosystems.

**Compliance with ethical standards.** The Autonomous University of the State of Mexico through its Internal Ethics Committee reviewed the work of researchers, guaranteeing compliance with national and international standards on this subject.

**Data Availability.** Data are available from Dr. Amaury-M. Arzate-Fernández (corresponding author: amaury1963@yahoo.com.mx), upon request.

**Author contribution statement (CRediT).** **AM Arzate-Fernández** – Conceptualization, funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing, review and editing., **I Martínez-Velasco** – Visualization, writing – original draft., **J.I. Reyes-Díaz**, **T.H. Norman-Mondragón** and **M.C. Corona-Rodríguez** - Writing, review and editing., **E.T. Cano-Perdono** and **J.L. Hernández-Rodríguez** – Formal analysis, Research, Data curation, Validation.

## REFERENCIAS

- Agarwal, T., Gupta, A.K., Patel, A.K. and Shekhawat, N.S., 2015. Micropropagation and validation of genetic homogeneity of Alhagi maurorum using SCoT, ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 120, pp. 313–323.
- Anu A., Babu, K. N. and Peter, K. V., 2004. Variations Among Somaclones and its Seedling Progeny

- in *Capsicum annuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), pp. 261–267. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009246.24216.ea>
- Arzate-Fernández Amaury-M., Miwa M., Shimada T., Yonekura T. and Ogawa K., 2005. Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. Bukosanense), and endemic and endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biology*, 20, pp. 57-65. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2005.00124.x>
- Azofeifa, Á., 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), pp. 153-175. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711514016>
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. and Staden, J.V., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, pp. 147–173.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(1), pp. 47-64. <https://doi.org/10.1007/s11738-997-0022-9>
- Cassells, A. C. and Curry, R. F., 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2-3), pp. 145-157. <https://doi.org/10.1023/A:1010692104861>
- Chen J.T. and Chang W.C., 2004. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 79, pp. 315–320.
- Chen, J. T. and Chang, W. C., 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50(2), pp. 169-173. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0002-8>
- Choy, S. H. and Yong, J. W., 2004. *The physiology of tropical orchids in relation to the industry*. 2<sup>nd</sup>. Edition. World Scientific Publishing Company, pp. 288-317. <https://doi.org/10.1142/5505>
- Cullis, M. A., Kunert, K., Engelborghs, I. and Swennen, R., 2006. Somaclonal Variation: Banana as a model for Identifying Genomic Changes. En: *Proceedings of The International Workshop on True-To-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants*, Morocco, 23-25 May, 2005. National Institute of Agronomic Research /INRA – Morocco. p. 167.
- Das, T., and Mitra, G. C., 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 22(2), pp. 95-103. <https://doi.org/10.1007/BF00043684>
- Ernst, R., 1975. Studies in asymbiotic culture of orchids. *American Orchid Society Bulletin*, 44, pp. 12–18.
- Grandbastien, M. A., Lucas, H., Morel, J. B., Mhiri, C., Vernhettes, S. and Casacuberta, J. M., 1997. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica*, 100, pp. 241-252. <https://doi.org/10.1023/A:1018302216927>
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J. L. and Rodríguez, B., 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis*, 1:3. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000104>
- Huan, L.V.T., Takamura, T. and Tanaka, M., 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166, pp. 1443–1449.
- Huang, W.T, Zeng, S.J., Wu, K.L., Zhang, J.X. and Duan, J., 2012. Research progresses on cross breeding of *Phalaenopsis*. *Journal Tropical Subtropical Flora*, 20, pp. 209–220 (in Chinese).
- Jain, S. M., Brar, D. S. and Ahloowalia, B. S., 2013. *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 32. Springer Science & Business Media.
- Jheng, F.Y., Do, Y.Y., Liauh, Y.W., Chung, J.P., Huang, P.L., 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170, pp.1133–1140.
- Kamboj, D., 2020. *Dendrobium and Vanda Orchids as Potential Cut Flower in North Indian Market*. GINMA, Hisar, Haryana.
- Karp, A., 1991. *On the current understanding of somaclonal variation*. Oxford surveys of plant molecular and cell biology, vol. 7, pp. 1-58.
- Kishor, R. and Devi, H. S., 2009. Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb. f × *Vanda stangeana* Reichb. f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. *Plant Cell*,



- Tissue and Organ Culture*, 97(2), pp. 121-129. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9506-1>
- Knudson, L., 1922. Non Symbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette*, 73, pp. 1-25. <http://dx.doi.org/10.1086/332956>
- Knudson, L., 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15, pp. 214-217.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical Applied Genetic*, 60, pp. 197-214.
- Li, C., Dong, N., Zhao, Y., Wu, S., Liu, Z. and Zhai, J., 2021. A review for the breeding of orchids: Current achievements and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 7(5), pp. 380-392. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.02.006>
- Marks, T. R., and Simpson, S. E., 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of horticultural science*, 65(2), pp. 103-111. <https://doi.org/10.1080/00221589.1990.11516036>
- Morel, G. M., 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin*, 29, pp. 495-497.
- Morel, G., 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Society News*, 20, pp. 3-11.
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
- Nagl, W., 1990. Polyploidy in differentiation and evolution. *The International Journal of Cell Cloning*, 8(4), pp. 216-223.
- Paek, K. Y., Hahn, E. J. and Park, S. Y., 2011. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. En: *Plant Embryo Culture*. Humana Press. pp. 293-306.
- Palombi, M.A., Lombardo, B. and Caboni, E., 2007. In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Reports*, 26, pp. 489-496.
- Park, S.Y., Murthy, H.N. and Paek, K.Y., 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk derived leaves. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 38, pp. 168-172.
- Peng, X., Zhang, T., Zhang, J., 2015. Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 122, pp. 67-77.
- Phillips, G.C. and Collins, G.B., 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*. 19, pp. 59-64.
- Schneeberger, R. G. and Cullis, C. A., 1991. Specific DNA alterations associated with the environmental induction of heritable changes in flax. *Genetics*, 128(3), pp. 619-630.
- Wang, C., Tian, M., Zhang, Y. and Ouyang, T., 2019. Molecular spectrum of somaclonal variation in PLB-regenerated *Oncidium* revealed by SLAF-seq. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(3), pp. 541-552. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01589-4>
- Wang, Q.M., Wang, L., 2012. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports*, 31, pp. 1535-1547
- Yam, T. W. and Arditti, J., 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1), pp. 1-56. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0066-3>
- Zhao, P., Wu, F., Feng, F.S. and Wang, W.J., 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44, pp.178-185.